

## イヌの growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) 1a と 血中グレリン動態に関する基礎的研究

北澤 多喜雄<sup>1,2)</sup>・石田 祥士<sup>2)</sup>・岩 賢<sup>2)</sup>・山形 友哉<sup>2)</sup>  
越智 建太<sup>2)</sup>・内田 英二<sup>1,2)</sup>・平賀 武夫<sup>2)</sup>・海谷 啓之<sup>3)</sup>

Basic biochemical study for growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) 1a  
and plasma ghrelin in dogs

Takio KITAZAWA<sup>1,2)</sup>, Shoji ISHIDA<sup>2)</sup>, Masaru IWA<sup>2)</sup>, Tomoya YAMAGATA<sup>2)</sup>,  
Kenta OCHI<sup>2)</sup>, Eiji UCHIDA<sup>1,2)</sup>, Takeo HIRAGA<sup>2)</sup> and Hiroyuki KAIYA<sup>3)</sup>  
(Accepted 10 January 2012)

### 1. 緒 言

下垂体からの成長ホルモン (GH) 分泌は growth hormone releasing hormone (GHRH) と somatostatin により調節されているが、1970 年代よりオピオイド系の低分子ペプチドが弱いながらも GH 放出を誘起することが報告され、GH 放出促進因子 (growth hormone secretagogue, GHS) と呼ばれていた。このペプチドを改良した growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) は、強い GH 分泌促進作用を *in vitro* だけではなく *in vivo* でも示した (Bowers et al., 1980; 1984)。下垂体の GH 分泌細胞に対する GHRH と GHRP-6 の作用を比較すると、GHRH による分泌には細胞内 cAMP の増加が、GHS による分泌には細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加が関与していることが明らかになった (Blake and Smith, 1991)。このことは GHS が GHRH 受容体とは別の受容体に作用し GH 分泌を促進することを示している。この受容体は GHS-R と呼ばれ、発現クローニング法によって 1996 年にクローニングされた (Howard et al., 1996)。グレリンは GHS-R の内因性リガンドとしてラットの胃から発見された 28 個のアミノ酸からなるペプチドである (Kojima et al., 1999; Kojima and Kangawa, 2005)。このペプチドの特徴として 3 位セリンのオクタン酸修飾がある。このような脂肪酸修飾を受けた活性ペプチドは現在のところグレリンのみであり、この脂肪酸修飾はグ

レリンの生物活性発現に必須である。現在、グレリンは魚類から哺乳動物まで多くの種類の脊椎動物でその存在が報告されている。哺乳動物では N 末端の 1 位から 10 位までの構造 (GSS(*n*-octanoyl)FLSPEHQ) が同一であり、進化の過程でも保存されてきたペプチドと考えられている (Kojima and Kangawa, 2005)。生体には、セリンが脂肪酸修飾を受けているグレリンの他に、活性はグレリンと同じで 14 位のグルタミンを欠く des-Gln<sup>14</sup> グレリン (Hosoda et al., 2000a) や、脂肪酸修飾を受けていない非活性型のデスアシルグレリン (des-acyl ghrelin) が存在している (Hosoda et al., 2000b)。当初、デスアシルグレリンはグレリンから脂肪酸が取れた分解産物と考えられていたが、近年、脂肪酸転移酵素 (ghrelin-*O*-acetyltransferase, GOAT) が発見され、この酵素の発現がグレリンを生成・分泌する胃で高いことから、デスアシルグレリンはグレリンの前駆体と考えられるようになった (Yang et al., 2008)。

グレリンは、GHS-R に結合し GH 分泌を促進する活性物質として発見されたため GH 放出作用が注目されていたが、その後の研究により他の下垂体ホルモンの分泌刺激作用、食欲刺激作用 (摂食量増加作用)、胃酸分泌促進作用、心血管作用、内分泌刺激作用、消化管運動促進作用が報告され、多くの生理作用を誘起する多機能な消化管ペプチドであることが明らかになった (Kojima and Kangawa, 2005;

<sup>1)</sup> 酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類

Department of Veterinary Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 酪農学園大学獣医学群獣医学類

Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>3)</sup> 国立循環器病研究センター研究所生化学部

Department of Biochemistry, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

Peeters, 2005)。この作用の多様性は、グレリンの作用点となる GHS-R が種々の組織に発現していることに起因している (Guan et al., 1997; Gnanapavan et al., 2002; Davenport et al., 2005; Ueberberg et al., 2009)。GHS-R には、7つの膜貫通領域を有し、Gq/11 と共役し細胞内情報伝達物質として inositol-trisphosphate と diacylglycerol を産生し種々の反応を仲介する GHS-R1a (機能的受容体) と 1 番目から 5 番目までの膜貫通領域しか持たず、グレリン受容体としての機能を示さない GHS-R1b が存在する (Kojima and Kangawa, 2005, Peeters 2005)。

モチリンはブタ十二指腸粘膜から分離精製された 22 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、G 蛋白質共役型のモチリン受容体に作用して生理反応を誘起する (Itoh Z., 1997)。モチリンの作用点であるモチリン受容体と GHS-R1a のアミノ酸配列は類似しており、ヒトの両受容体では全体で 52%、7 つの膜貫通部位では 86% の相同性がある。また、これらのリガンドであるモチリンとグレリンも部分的にアミノ酸配列が類似している (36%, Asakawa et al., 2001; Peeters, 2005)。グレリンとモチリンの構造が類似すること、グレリンが胃粘膜で産生分泌されること、受容体の構造が類似することなどからグレリンの消化管運動におよぼす影響が広く研究されている。グレリンはヒト、ラット、マウスにおいて、in vivo で胃排出能を増加させ腸管輸送能を促進する。また、in vivo の運動測定実験では、ラット、マウスおよびモルモットにおいて胃の運動を亢進することが報告されている (Masuda et al., 2000; Fujino et al., 2003; Fukuda et al., 2004; Depoortere et al., 2005; Kitazawa et al., 2005; Tack et al., 2005, 2006; Nakamura et al., 2010)。迷走神経の切断や知覚神経を破壊する capsaicin 処置によりグレリンの消化管運動亢進作用が抑制されることから、グレリンは迷走神経終末の GHS-R に作用して迷走-迷走神経反射経路を刺激することが示された (Fujino et al., 2003; Fukuda et al., 2004; Nakamura et al., 2010)。しかながら、グレリンが迷走神経遮断後にも消化管運動を亢進すること、摘出消化管でも収縮亢進作用が誘起されることから、胃腸管自体にも GHS-R1a が存在し消化管収縮に寄与することもわかっている (Dass et al., 2003; Fujino et al., 2003; Edholm et al., 2004; Kitazawa et al., 2005)。グレリンの消化管運動に与える影響の in vivo 解析は、これまでラット、マウス、モルモット、ヒトおよびイヌの 5 種類の動物で行われている。イヌを除く 4 種類の動

物種では、グレリンにより消化管運動の亢進が起きることが明らかになっているが、イヌでは、グレリンは GH 分泌を刺激するが、消化管運動や胃排出能に影響を与えないことが報告されている (Masuda et al., 2000; Kitazawa et al., 2005; Ohno et al., 2006; Tack et al., 2006; Nakamura et al., 2010)。また、GHS である GHRP-2 適用によりイヌ消化管運動は亢進されず、むしろ減弱するとの報告もある (Kudoh et al., 2009)。これまでの機能的検討で、グレリンが in vivo で消化管運動を亢進しないのはイヌだけであり、このことはグレリン研究においてイヌが興味深い動物種であることを示唆する。

グレリンは GH 放出や食欲、内分泌・外分泌を調節することによりエネルギーの摂取と消費を調節し、生体機能の維持に重要な役割を果たしている。ヒトでは、このグレリンが関与する調節機構の破綻により神経性食欲不振症や過食症などの摂食障害、それらに起因する肥満、糖尿病等の内分泌性疾患が起きる可能性が示されている (Kojima and Kangawa, 2005)。また消化管関連では、胃腸管運動障害、過敏性腸症候群、クローン病およびある種の腫瘍で血中グレリン濃度が変化することが明らかになっている (Jeffery et al., 2011)。これらのことから、ヒトではグレリンおよびその関連化合物を食欲不振や消化管運動障害の治療に適用できる可能性を求め臨床研究が進んでいる。近年、獣医の臨床領域でも飼養環境の改善や獣医療の発展により動物の寿命が伸び、愛玩動物であるイヌやネコにおいて肥満、糖尿病や腫瘍などの「生活習慣病」が増加する傾向にある。このような病態にグレリンが関与している可能性を否定することは出来ない。しかしながら、現在、イヌに関するグレリンの基礎的知識はそれほど多くなく、病気との関連も肥満で血中グレリン濃度が増加することが確認されているにすぎない (Yokoyama et al., 2005b)。

本研究では、獣医臨床上、重要な動物種でありグレリンの消化管運動におよぼす影響が他の哺乳類とは異なるイヌにおいて、グレリン関連の基礎的知見を集めることを目的として、①GHS-R1a のクローニング、②GHS-R1a の組織分布、③摂餌、絶食によるグレリン濃度の変動、④各種疾患における血中グレリン濃度の変化の 4 点について検討した。

## 2. 実験材料と方法

イヌを用いた全ての実験は酪農学園大学実験動物委員会が定めたガイドラインに従って実施した (承認番号、VH21B25, VH23B4)。

### 1) 実験動物

本実験において、血液試料の採取は、臨床的に健康なビーグル犬 10 頭を用いて行った。性別は雄 3 頭、雌 7 頭、年齢は 2~5 歳 (平均値 3 歳)、体重は 7.5~18.0 kg (平均値 11.7 kg) であった。各個体は十分な広さのケージ内 (0.7×1.2×1.2 m) で一頭ずつ飼育し、建物内の温度は 18℃~28℃、清潔な飼育環境を保った。通常、水は水道水を自由飲水させ、食餌は 1 日 2 回 (9:00 と 18:00) 体重当たり 20 g を与えた (3.77 kcal/g, Science Diet Adult, Hill's)。

### 2) 血中グレリン, グルコースおよびインスリン濃度測定法

各実験 1 週間前から、実験項目に合わせて食餌の回数を 1 日 1 回 (9:00) または 1 日 2 回 (9:00 と 18:00) に設定し馴化させた。この際、1 日に摂取させるカロリーは以下の式で計算し一定とした ( $1.8 \times (30 \times \text{体重 (kg)} + 70)$  kcal)。このように決まった食餌スケジュールを繰り返しているイヌ (6 頭) で、2 時間間隔で採血を行い、その血中グレリン (アシルグレリン)、血中デスアシルグレリン、グルコース、インスリン濃度を測定し、摂餌との関係を検討した。採血は頸静脈または橈側皮静脈から行い、採取した血液は EDTA/アプロチニン入り採血管に移し転倒混和した。得られた血液試料は氷上保存し、採血から 10 分以内に 4℃ で 3000 回転、15 分間の条件で遠心し血漿分離を行った。遠心して得られた血漿は、測定項目毎にエッペンドルフチューブに分注し、測定まで -30℃ で保存した。

絶食および再摂餌の血漿グレリン濃度に与える影響を明らかにするために 1 日 2 回の摂餌で一週間順化したイヌ 6 頭を 48 時間絶食した後、再摂餌させその前後で採血を行い、血漿グレリン、グルコース、インスリン濃度の変化を検討した。摂餌を行わない群も設定し、血漿グレリン濃度の絶食 (空腹) 期での推移を明らかにした。採血は前述したように頸静脈又は橈側皮静脈から行い、摂餌の時間を 0 分とし、摂餌前 60, 40, 20 分、摂餌後は 10 分または 20 分の間隔で最大で 340 分まで行い、絶食および摂餌の血中ホルモン濃度、グルコース濃度におよぼす影響を検討した。

血中グレリンの測定には血漿を塩酸で酸性化することが推奨されているので、塩酸処置した血漿サンプルと塩酸処理をしなかった血漿サンプルのグレリン濃度を比較した。その結果、それぞれのサンプルでのグレリン濃度は  $64.0 \pm 7.1$  fmol/ml ( $n=40$ )、 $5.8 \pm 0.7$  fmol/ml ( $n=20$ ) であり、両者の間には有

意差が認められた。それ故、グレリン測定用の血漿は、血漿当たり 1/10 容量の 1 N 塩酸を加えた後に攪拌し凍結した。血漿グレリン濃度の測定には Active ghrelin ELISA kit (SCETI 株式会社)、血漿デスアシルグレリン濃度の測定には Desacyl ghrelin ELISA kit (SCETI 株式会社) をそれぞれ使用した。また、血漿インスリン濃度の測定には、イヌインスリン測定キット (森永生化学研究所) を用いた。いずれの場合も凍結しておいた血漿試料を室温で解凍した後に、キットに附属していたマニュアルに従って分注・反応させ吸光値をマイクロプレートリーダー (Thermo 株式会社) で読み取り、血中 1 ml 中の濃度に換算した。血中グルコース濃度は、BECKMAN・COULTER SYNCHRON Clinical System CX (ベックマン・コールター株式会社) で測定し mg/dl で示した。

### 3) 動物病院から得た血液サンプルでのグレリン濃度の測定

2011 年 1 月から 8 月までの期間、酪農学園大学動物病院 (江別市) に来院したイヌ (72 頭 (雄 37 頭、雌 35 頭)、年齢 1~15 歳) から飼い主の同意を得て診断のために採血した血液から得た血漿の一部を塩酸処理し、グレリン測定用サンプルとして保存した。各種の症例の中から消化器系疾患と内分泌性疾患の 2 群を抽出した。さらに、消化器系疾患は多中心型リンパ腫、消化器型リンパ腫、炎症性腸疾患、リンパ管拡張症に、内分泌性疾患は甲状腺機能低下症、クッシング病、アジソン病に区分して、各疾患イヌの血中グレリン、デスアシルグレリン濃度を測定し、正常イヌの値と比較し種々の病態でグレリン濃度が変化するか否かを考察した。正常犬の血漿グレリン値は、摂餌前に来院するイヌが多いことから、日内変化を検討した実験の摂餌前 (午前 8 時) の値を使用した。

### 4) イヌ GHS-R1a のクローニング

麻酔下で安楽致死させたビーグル犬 (2011 年 7 月、合計 4 頭、雄 1 頭、雌 3 頭、9-12 Kg, 平均 8 歳) から下垂体を摘出し、細切後 RNAlater 中にて保存した。Total RNA は TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を QuantiTect RT Kit と Oligo-dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を作製した。

イヌ GHS-R1a の塩基配列は NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されている部分配列を参照した (NM\_001099945)。この配列を基に受

容体タンパク質をコードしている部分を増幅するプライマーを作製した (dog GHSR-code-s: ATG CGG AAC GCG ACG GCC CGC GAG; dog GHSR-code-AS: TCA TGT ATT AAT ACT AGA CTC TGT)。上述の下垂体 total RNA から作製した cDNA を鋳型として, HotSTAR Taq Plus mix (QIAGEN) を用いて RT-PCR を以下の条件で行った (95°C で 5 分, その後 95°C で 0.5 分, 58°C で 0.5 分, 72°C で 1 分のサイクルを 35 サイクル繰り返し, その後 72°C での伸長反応 3 分)。約 1000 bp 付近に見られた単一バンドを切り出し, Wizard PCR preps (Promega) で DNA 産物を抽出後, pCRII-TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローニングして大腸菌 (JM109) に形質転換した。大腸菌はアンピシリンを含むアガロース培地に播種後, 37°C で 16 時間以上培養した。増殖したコロニーを数個ピックアップし, 一部を M13 forward および reverse プライマーにて PCR を行い, インサートのサイズを確認した。また, 一部は 2YT 培地にて大腸菌を増殖させた。目的サイズのインサートを含む大腸菌からプラスミド DNA を抽出し, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), M13 forward あるいは reverse プライマーを用いて PCR を行い, 塩基配列解析用 DNA 産物を調整した。塩基配列は ABI 3130DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いて解析した。

#### 5) 定量的リアルタイム PCR によるイヌ GHS-R1a mRNA 量の定量 (中枢神経系と末梢組織)

GHS-R1a mRNA 量を定量するため, 標準となる DNA 溶液を上記した方法でクローン化したプラスミド DNA から調整した。塩基配列を確認したプラスミド DNA は制限酵素 (Xba-I) を用いて 37°C, 1 時間で消化し直鎖 2 本鎖 DNA とした。フェノール・クロロホルム精製後, エタノール沈殿を行い洗浄した。適量の MilliQ 水に溶解して定量し,  $5 \times 10^8$  分子/ $\mu\text{l}$  になるように TE 溶液にて希釈した。

リアルタイム PCR には QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて, LightCycler 480 (Roche) にて測定した。QuantiFast SYBR Green mix (20  $\mu\text{l}$ ) は  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3$  分子を含む DNA 標準溶液, またはサンプルの鋳型 cDNA (100 ng), 0.5 pM プライマー (dog GHSR1a-Q-s: GGT GTC CAG CGT CTT CTT CTT CCT; dog GHSR1a-Q-AS: ACA CCA CGA CAG CGA GCA TCT TCA) にて構成された。PCR は以下のプログラムで行い (95°C で 5 分, その後 95°C で 10 秒, 60°C

で 30 秒の繰り返しを 40 サイクル), その後, PCR 産物の融解曲線を解析した。DNA 量は, LightCycler 480 software の 2nd Derivative Max 法を用いて定量し, 融解曲線による解析で目的物が増幅されていると判断でき, さらにアガロースゲル電気泳動で目的サイズのバンドが検出されたものについてデータ集計した。

#### 6) 統計処理法

論文中に表記された数値は, 各例数における平均値とその標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M) を示している。また, 各実験において 2 群間の平均値における差の検定は Student's t-test を用いて行い, 危険率が 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差があると判断した。2 種類の測定値間の相関の検定は, 正規分布していないものではスピアマンの順位相関係数を, 正規分布していたものではピアソンの相関係数を用いて行った。

### 3. 結 果

#### 1) イヌ GHS-R1a のクローニングと他動物種との比較

登録されている GHS-R1a の部分配列 (NM\_001099945) を参考にして, イヌでグレリンの作用点となる GHS-R1a をクローニングし, 図 1 にそのアミノ酸配列を示した。イヌの GHS-R1a は 349 個のアミノ酸から構成され, ブタ, ウシ, ウマ, ウサギ, ラット, マウス, モルモット, ヒトなどの哺乳動物とは 85~87% 程度の相同性を示し, 系統樹解析では単独の系統として分類された (図 2)。一方, 哺乳動物以外の動物種との比較では, 有袋類のオポッサムでは相同性は低下し (75%), 鳥類や魚類においても相同性は 56~70% 程度であった (図 2)。

#### 2) イヌ GHS-R1a の組織分布

イヌの脳を 10 箇所に分け, 各 4 頭において GHS-R1a mRNA の発現量を解析した。mRNA の発現は, 下垂体で最も高く ( $5,075 \pm 2,847$  copies/100ng total mRNA), 次いで嗅球 ( $1,070 \pm 823$  copies), 小脳 ( $823 \pm 610$  copies) で多かった。中枢の他の部位では, 視床下部が  $370 \pm 178$  copies であり, 大脳皮質 ( $51 \pm 38$  copies), 海馬 ( $65 \pm 17$  copies), 視床 ( $82 \pm 32$  copies), 中脳 ( $188 \pm 62$  copies), 橋 ( $140 \pm 38$  copies) および延髄 ( $156 \pm 54$  copies) に比べ高い遺伝子発現を示した。

末梢組織では, 食道, 胃食道部, 胃幽門部, 十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸, 肝臓, 心房, 心室, 腎臓, 副腎, 膵臓において GHS-R1a mRNA の発現を検討

Dog	1	MRNATAREG-PGSAGW-----D-LL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVRRFRELRTTNNLYLCSL	68
Human	1	MNATPSEEPGNLT-LADLD-WDASPGNDSLGEDELL--OL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	85
Rat	1	MNATPSEEPGNVT-L-DLD-WDASFGNDSLPEDELL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	84
Horse	1	MNATPSEEPGNLT-LPDLG-WDASPDNDSLAEELL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	85
Pig	1	MNATPSEEPGNLT-LPDLG-WDAPPENDSLVEELL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	85
Cattle	1	MNATPSEEPGNLT-LPDLG-WDALPDNDSLDELPL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	85
Panda	1	MNATPSEEPGNLT-LQDLG-WDALPDNDSLDELPL--PL-FPAPLDAGVTATCVAFVAVGVAGNLLVLLVSRFRELRTTNNLYLSSM	85
Chicken	1	-----REGSENRT-GGESPL-RL-FPAPVLTGIVTACVLLFVAVGVAGNLLVLLVSRFRDMRTTNNLYLSSM	66
Goldfish-la-1	1	M-----PTWTNRSN-CSFNCSWDENATYWGFE-EHPV--NI-FPAPVLTGIVTACVLLFVAVGVAGNLLVLLVTKYKDMRTTNNLYLSSM	79
Tilapia	1	M-----PSWPS-OLECLHRNCTWEETNNTISKADPSP-PLNYSITLDTAITVACTLLELLCIVAGNVMILLVVSRYRDMRTTNNLYLCSM	83
Dog	69	ACSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LALLAVAVAF	156
Human	86	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	173
Rat	85	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	172
Horse	86	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	173
Pig	86	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	173
Cattle	86	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	173
Panda	86	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	173
Chicken	67	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	154
Goldfish-la-1	80	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	167
Tilapia	84	AFSDLLIFLCMPDLLVRLWYRPNWFGDILLCKLFOFVSECTYAVVLAITALSVERYEAI CFPLRAKVVVTKGR-VK-LVILVAVAF	171
Dog	157	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-R--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	231
Human	174	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-W--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAV	248
Rat	173	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-R--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	246
Horse	174	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-Q--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	248
Pig	174	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-R--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	248
Cattle	174	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-R--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	248
Panda	174	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-D-P-R--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	248
Chicken	155	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-N-P-L--STN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	227
Goldfish-la-1	168	SAGPIFVIVGVGHEH-CT-N-S-W--DTN---E-----CRATEAVRSGLLTAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	240
Tilapia	172	SAGPIFVIVGVGHEH-CPLNFSSWMNEINLFLFETDTRCKMHHVAVQSCIMGAMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLTGRLLWRRRRGDAA	260
Dog	232	VGAS-L-REQSHRQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-LEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	316
Human	249	VGAS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-LEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	333
Rat	247	VGAS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-LEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	331
Horse	249	VGAS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-LEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	333
Pig	249	VGSS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-VEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	333
Cattle	249	VGAS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-VEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	333
Panda	249	VGAS-L-RDQNHKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-PGS-LEIAQISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	333
Chicken	228	IGPSTIIRDKNNKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-FSKSFE-AGS-LEIAVISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	314
Goldfish-la-1	241	IQONASSREKNNKQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYL-ISKSTE-MGSPV-MSVISYCNLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	327
Tilapia	261	MSNRVSHRDKSNRQTVKMLAVVVGAFILCWLPHFVGRYLQF-RSLDAEAP-L-LSLLSEYCSLVSEVLFYLSAAINPILYNLMSKRYRVA	347
Dog	317	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	349
Human	334	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	366
Rat	332	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	364
Horse	334	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	366
Pig	334	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	366
Cattle	334	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	366
Panda	334	VFKLLGE-EPFSQR-KL-STLKDESSRAWTESSINT	366
Chicken	315	ACRFLGL-KALPKK-RL-SSTKQDSSRAWTEPTVAT	347
Goldfish-la-1	328	ACKLFLV-HH-SPRIST-SAVKGETSFCWTESTASL	360
Tilapia	348	AARFLGLTDSLPPRGRTASTVKGDSNGWTESTISF	383

図1 イヌから得られたGHS-R1aのアミノ酸配列と他動物種との比較

イヌ下垂体からGHS-R1aをクローニングし、ラット、ウマ、ブタ、ウシ、バンダ、ニワトリ、キンギョおよびテラピアのGHS-R1a構造と比較した。黒の網掛けは、全動物種での一致を、灰色の網掛けは、半数以上の動物種で一致していることを示している。各種動物のGHS-R1aのアミノ酸配列はDDBJ/EMBL/GeneBank data baseから得た。

したが、肝臓以外ではRT-PCRのバンドとしては確認できるものの、微量なために数値として発現量を示すことができなかった。肝臓では、 $236 \pm 66$  copies ( $n=4$ )のmRNAが検出され、末梢組織で唯一高い発現が観察された。

### 3) グレリンとデスアシルグレリンの濃度比較

イヌ血中に存在するグレリンとデスアシルグレリンの比率を明らかにするために、摂餌1回または2回の条件で2時間おきに採血した血漿サンプルから42検体を選ばず、同じサンプルでグレリンとデスアシルグレリンの濃度をそれぞれ測定しその相関を解析した(図3)。無作為に選んだサンプルでのグレリン濃度の最高値は62.7 fmol/ml、最小値は

13.1 fmol/mlであり、平均値は $37.2 \pm 2.9$  fmol/ml ( $n=42$ )であった。一方、デスアシルグレリン濃度の最高値は464.4 fmol/ml、最小値は49.4 fmol/ml、平均値は $198.0 \pm 20.1$  fmol/ml ( $n=42$ )であった。図3に示したように両者の濃度間には高い相関( $R=0.845$ )が認められた。回帰直線を引き、その傾きからイヌ血漿におけるグレリンとデスアシルグレリンの存在比を推察すると1:5.9となった。

### 4) 血中グレリン、インスリンおよびグルコース濃度と摂餌との関係

摂餌回数1日1回(9:00)の条件で2時間ごとに採血を行い、グレリン濃度と摂餌の関係を検討した。図4に示したように、有意差は認められなかったも

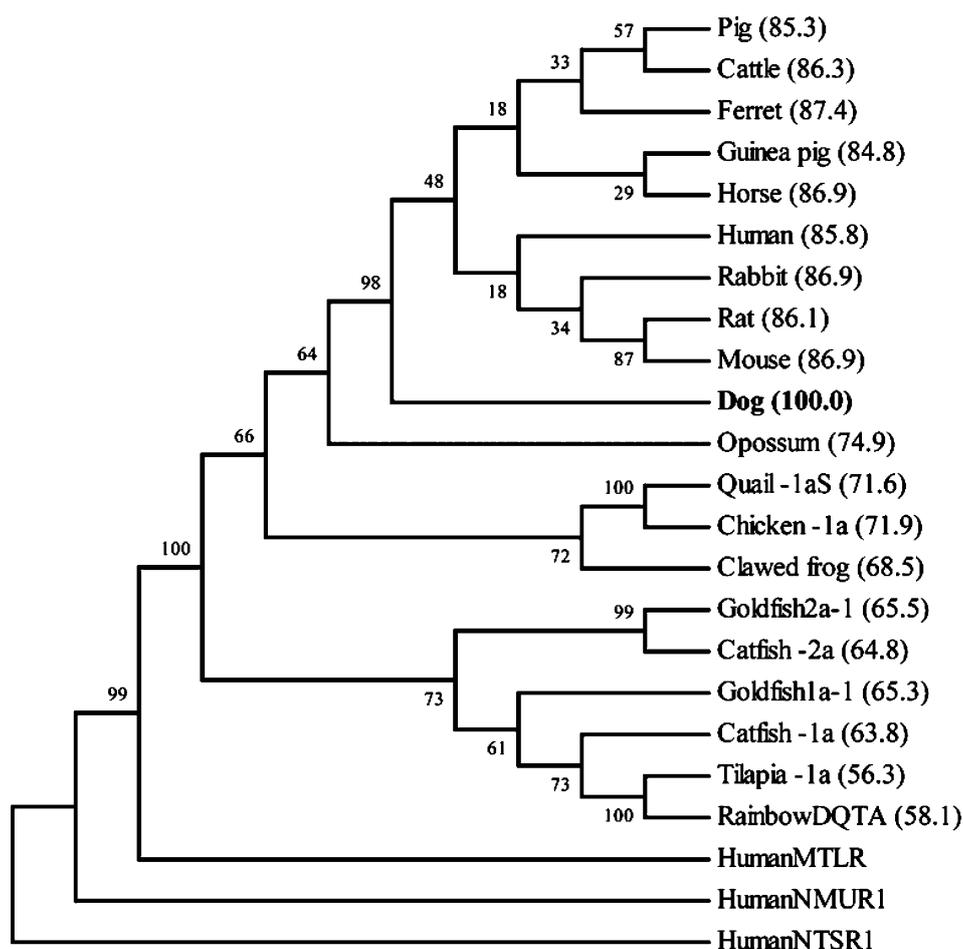


図2 イヌ GHS-R1a の系統樹解析

イヌ GHS-R1a の系統的な位置を解析するために MEGA4 の NJ 法 (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて GHS-R1a の系統樹を作成した。ヒト motilin receptor (MTLR), neuromedin U receptor-1 (NMUR1), neurotensin receptor-1 (NTSR1) も近縁ペプチドの受容体として示した。分岐の数値は bootstrap 値を、動物種の横にある括弧内の数字はイヌ GHS-R1a のアミノ酸配列を 100 とした時の相同性を示す。

このグレリン濃度は摂餌後に減少する傾向があった。すなわち、グレリン濃度の平均値は 6 時, 8 時, 10 時, 12 時, 14 時, 16 時でそれぞれ 38.6 fmol/ml, 44.0 fmol/ml, 45.1 fmol/ml, 28.6 fmol/ml, 30.7 fmol/ml, 44.7 fmol/ml を示し, 12 時には低下し 16~18 時には摂餌前のレベルに戻った (図 4A)。グルコース濃度は摂餌直後にわずかな上昇が観察されたものの, すぐに元のレベルに戻っていた (図 4B)。一方, インスリン濃度は, 摂餌後にゆっくりと上昇し 16 時にピークを迎えた後に低下した (図 4C)。同一血漿でグレリン, グルコース, インスリンを測定しているので, グレリン濃度とグルコース濃度 (53 検体), グレリン濃度とインスリン濃度 (53 検体), グルコース濃度とインスリン濃度 (53 検体) の間に相関が認められるか否かを検討した。相関係数 (R) はそれぞれ 0.17, 0.4, 0.56 で, グレリンとインスリン (R=0.4), グルコースとインスリン (R=0.56) の間に有

意 ( $P < 0.05$ ) な相関が認められた。

摂餌回数 1 日 2 回 (9:00 と 18:00) の状態においても, グレリン濃度は摂餌後に低下する傾向があったが, 摂餌回数 1 日 1 回の成績と比較すると著明ではなかった。9 時の摂餌前後のグレリン濃度の平均値は, それぞれ 45.7 fmol/ml (6 時), 41.2 fmol/ml (8 時), 42.0 fmol/ml (10 時), 40.0 fmol/ml (12 時), 37.6 fmol/ml (14 時), 32.9 fmol/ml (16 時) であった。一方, グルコース濃度は摂餌によってもほとんど変化しなかった。対照的に, インスリン濃度は 2 回の摂餌後それぞれで上昇した (図 5)。同一検体におけるグレリン濃度とグルコース濃度 (53 検体), グレリン濃度とインスリン濃度 (53 検体), グルコース濃度とインスリン濃度 (53 検体) の相関係数はそれぞれ 0.22, 0.1, 0.12 であり, 1 日 1 回摂餌とは異なり, いずれの組合せでも有意な相関は認められなかった。

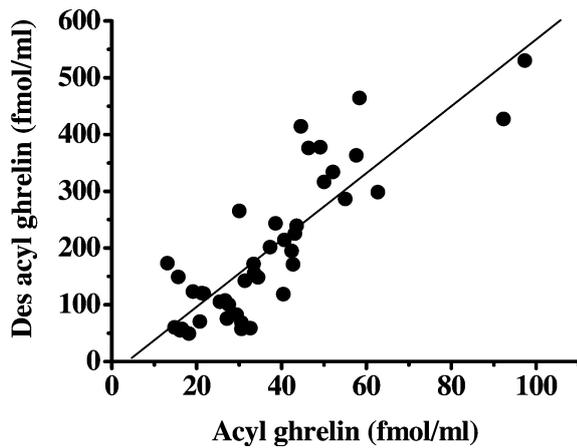


図3 同一血漿サンプルにおけるグレリン濃度とデスアシルグレリン濃度の比較

同一血漿サンプル中のグレリンとデスアシルグレリン濃度をそれぞれのペプチドを特異的に測定できる ELISA kit (方法参照) で測定し、グレリン濃度 (fmol/ml) を横軸、デスアシルグレリン濃度 (fmol/ml) を縦軸にプロットし両者の関係を解析した。回帰直線の式は  $Y=5.9X-21.4$ 、相関係数と有意性は  $R=0.85$  および  $P<0.0001$  であった。

#### 5) 48時間絶食イヌにおけるグレリン、インスリンおよびグルコース濃度の変動

前述の結果から、2時間の間隔で採血を行った場合、摂餌によりグレリン濃度が減少する傾向が示され、その傾向は1日1回摂餌の方が著明であった。そこで、絶食期間を48時間として摂餌後の血漿グレリン、インスリン、グルコース濃度の推移を観察した。48時間絶食させ午前9時に餌を与えた場合、血中グレリン濃度は給餌後約40分後から低下し始め、1時間20分後には最低値を示した(図6A)。グレリン濃度は、この状態(20~28 fmol/ml)で約2時間程度推移したが、5時間後(14時)からゆっくりと上昇し、摂餌前とほぼ同じレベルに戻った(図6A)。摂餌前1時間(8時~9時、4回採血)のグレリン濃度は  $37.5 \pm 3.7$  fmol/ml ( $n=16$ )、摂餌1時間後(10時~11時、4回採血)のグレリン濃度は  $24.6 \pm 2.3$  fmol/ml ( $n=16$ ) であり、両値の間には有意差が認められた。摂餌によって、グルコース濃度は多少変動したが、100 mg/dl 前後で推移し著明な変化は認められなかった(図6B)。一方、インスリン濃度は摂餌後に0.5 ng/ml から2.0 ng/ml までゆっくりと上昇した(図6C)。

図7には、48時間絶食したイヌで摂餌を行わなかった場合の血漿グレリン濃度の変化を示した。4頭中3頭のイヌ(Dog 2, 3, 4)において、グレリン濃度がサージ様に増加していた。Dog 2, 3においてサージ様変化は周期的に出現し、その周期はおおよそ2時間であった。一方、この時にグルコースおよび

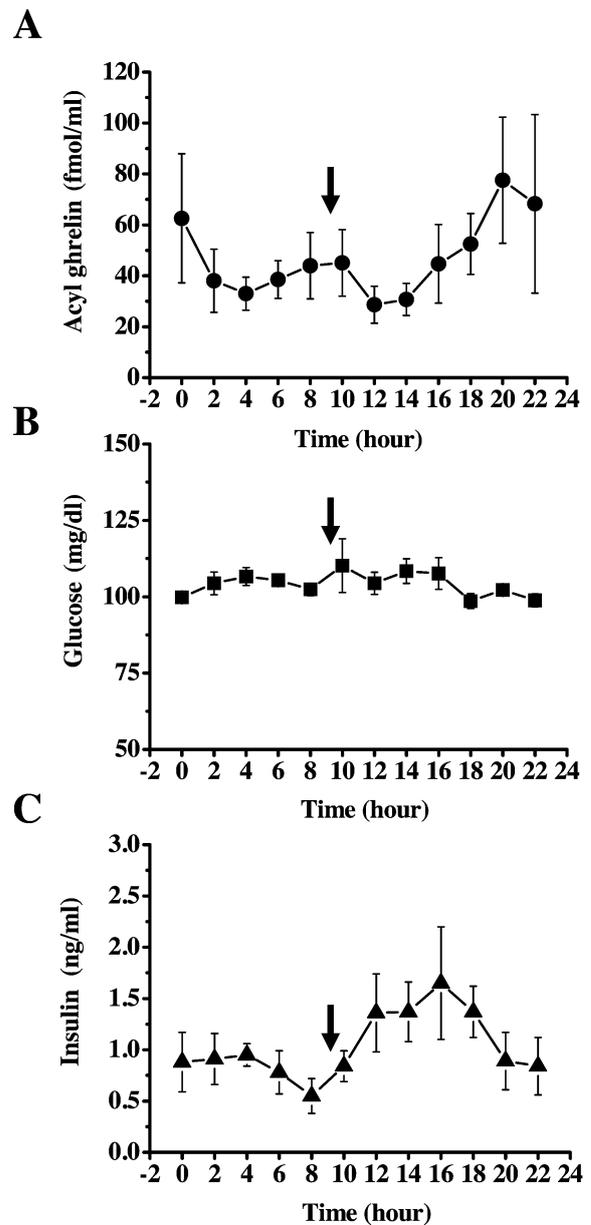


図4 摂餌1日1回条件(9:00)での血漿グレリン、グルコースおよびインスリン濃度の日内変動

2時間おきに12回の採血を行い、それぞれの時点での血漿グレリン(A)、グルコース(B)およびインスリン濃度(C)を測定し日内変化として示した。矢印は摂餌時間(9:00)を示す。各点は平均値と標準誤差( $n=4-5$ )である。

インスリンは著明な変化を示さず、それぞれ90 mg/dl 前後、0.5 ng/ml 前後の値であった。

#### 6) 各種疾患と血中グレリン濃度との関連

正常ビーグル犬の摂餌前のグレリン濃度は、 $37.2 \pm 6.0$  fmol/ml ( $n=10$ ) と算出され、この値を健康なイヌのグレリン濃度と考えた。今回、2例以上の症例があった疾患でグレリン濃度を測定した

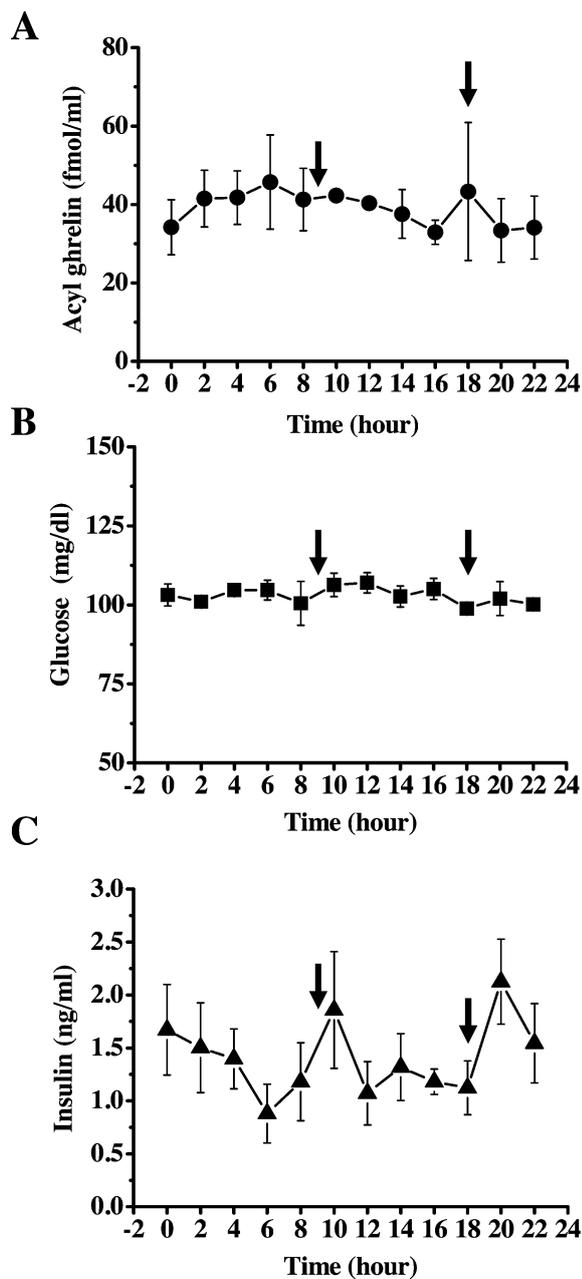


図5 摂餌1日2回条件(9:00と18:00)での血漿グレリン、グルコースおよびインスリン濃度の日内変動

2時間おきに12回の採血を行い、それぞれの時点での血中グレリン(A)、グルコース(B)およびインスリン濃度(C)を測定し日内変化として示した。矢印は摂餌時間(9:00と18:00)を示す。18時においては、採血後に餌を与えている。各点は平均値と標準誤差(n=4-5)である。

が、消化器系疾患では、多中心型リンパ腫で25.3±9.2 fmol/ml (n=7), 消化器型リンパ腫で8.9±1.4 fmol/ml (n=5), 炎症性腸疾患で20.8±8.0 fmol/ml (n=3), リンパ管拡張症で11.6 fmol/ml (n=2)であり、消化器型リンパ腫において有意なグレリン濃度の低下が認められた。一方、内分泌性疾患では、

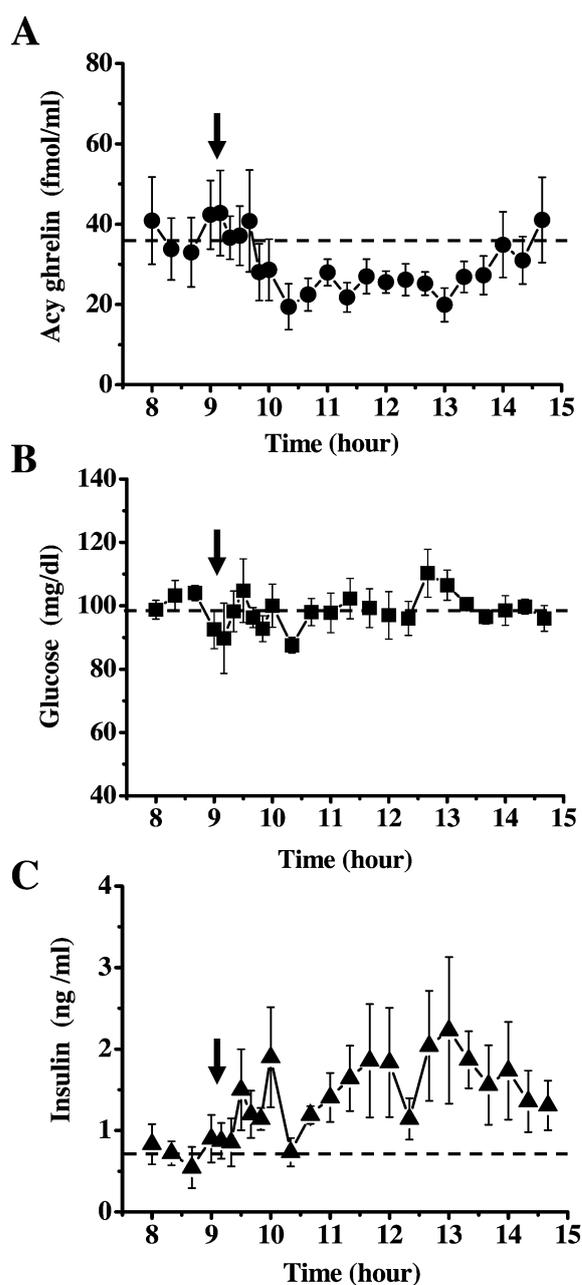


図6 摂餌による血漿グレリン、グルコースおよびインスリン濃度の変化(48時間絶食イヌを用いての検討)

実験日の9時まで48時間の絶食を行った後、9時に摂餌させ最初の1時間は10分間隔、10時から20分間隔で14時40分まで採血した。得られた血漿中のグレリン(A)、グルコース(B)およびインスリン濃度(C)を測定し経時変化として示した。矢印は摂餌時間(9:00)を、点線は摂餌前の平均値を示した。各点は平均値と標準誤差(n=4)である。

甲状腺機能低下症で27.3±6.3 fmol/ml (n=5), クッシング病で14±6.1 fmol/ml (n=3), アジソン病で44.4 fmol/ml (n=2)であり、クッシング病で有意な減少が認められた。

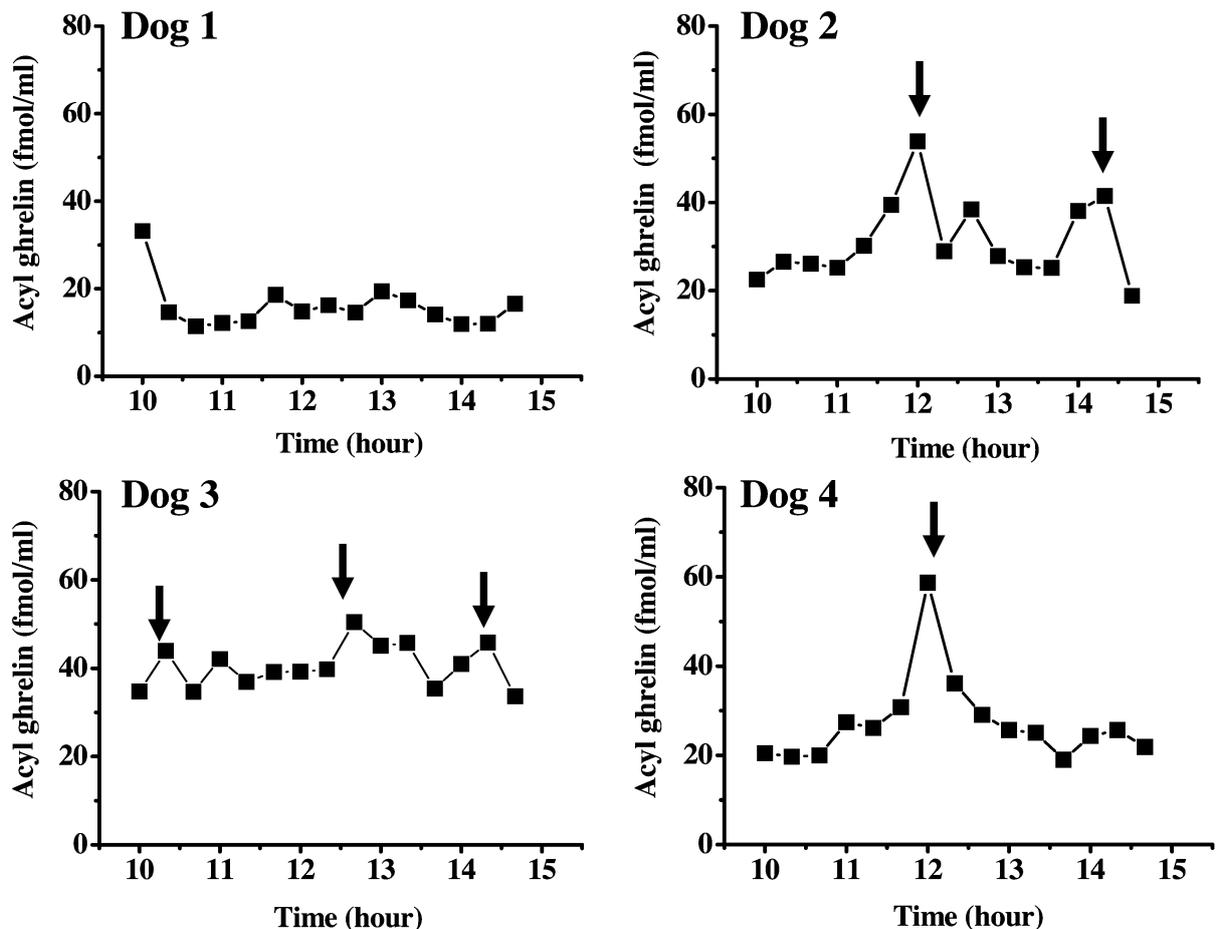


図7 絶食時における血漿グレリン濃度の変動

49時間絶食したイヌ4頭から20分毎に採血し、それぞれのイヌ (Dog1~Dog4) における血漿グレリン濃度の変動を示した。4頭中3頭のイヌにおいてグレリン濃度が空腹期にサージ様に増加した。矢印はグレリン濃度のピークを示す。

デスアシルグレリン濃度は正常イヌでは  $189 \pm 44$  fmol/ml ( $n=4$ ) であったが、多中心型リンパ腫で  $202 \pm 25$  fmol/ml ( $n=7$ )、消化器型リンパ腫で  $114 \pm 34$  fmol/ml ( $n=5$ )、炎症性腸疾患で  $196 \pm 58$  fmol/ml ( $n=3$ )、リンパ管拡張症で  $98$  fmol/ml ( $n=2$ )、甲状腺機能低下症で  $311 \pm 75$  fmol/ml ( $n=5$ )、クッシング病で  $124 \pm 24$  fmol/ml ( $n=3$ )、アジソン病で  $397$  fmol/ml ( $n=2$ ) となり、消化器型リンパ腫とクッシング病で減少する傾向が見られたが有意な変化ではなかった。

同一血漿サンプルでのグレリン、デスアシルグレリン濃度の測定値から両者の比 (デスアシルグレリン:グレリン) を算出すると、正常イヌでは 5.1、多中心型リンパ腫では 8.0、消化器型リンパ腫では 12.8、炎症性腸疾患では 9.3、リンパ管拡張症では 8.9、甲状腺機能低下症では 11.4、クッシング病では 8.9、アジソン病では 9.0 となり、いずれの疾患でもデスアシルグレリン:グレリンの比率が増加する傾

向が認められた。

#### 4. 考 察

本研究では、獣医临床上重要な動物種であり、in vivo でグレリンにより消化管運動の亢進が起きない (Ohno et al., 2006) イヌにおいて、グレリンの作用点である GHS-R1a の構造を決定し、その組織分布を初めて明らかにした。また、種々の摂餌条件、疾患下でグレリン濃度を測定し、グレリンの生理的または病態生理学的な意義についても考察した。

今回、イヌの下垂体から同定した GHS-R1a (グレリン受容体) は 349 個のアミノ酸残基からなり、他の哺乳類の GHS-R1a (364~366 個) と比較し長さが短かった。また、系統樹解析でイヌ GHS-R1a は他の哺乳動物の GHS-R1a とは異なったクレードに分類されたことから、イヌが比較に用いた哺乳類とは異なる進化の過程をたどった可能性が推察される。イヌ GHS-R1a の構造を 100% とした場合、他の哺乳

類との相同性は85~87%とほぼ一定であった。GHS-R1aのリガンドとなるグレリンの構造が種々の哺乳類でも報告されているが、N末端の1~10位のアミノ酸構造(GSS(*n*-octanoyl)FLSPEHQ)は完全に保存されており、イヌグレリンとラットグレリンを比べても12位のロイシン(イヌ)がアラニン(ラット)に変わっているにすぎない(Kojima and Kangawa, 2005)。以上のことから、グレリン/GHS-R1a系では、リガンドよりも受容体の動物種差の方が顕著であることがわかる。イヌGHS-R1a構造の差異は、グレリンに対する反応性がイヌで他の動物種と異なってくる可能性を示唆するので、今後、受容体発現細胞を利用し受容体の機能解析を行うことが必要であろう。グレリンは食欲を調節し、生体のエネルギーバランスの調節に関与するペプチドであるので(Nakazato et al., 2001; Kojima and Kangawa, 2005)、イヌGHS-R1aのアミノ酸配列が他の動物と異なる理由のひとつに食性の違い(肉食、雑食、草食)を挙げることができるかもしれない。この仮説を確かめるためには、肉食のネコなどを用いGHS-R1aの配列や組織分布を調べ、イヌを含めた他の動物種と比較を行う必要がある。

GHS-R1a mRNAのイヌ中枢神経系での発現を調べたところ、これまでのヒト、ラット、モルモットにおける報告(Guan et al., 1997; Gnanapavan et al., 2002; Ueberberg et al., 2009; Kitazawa et al., 2011)に一致して、下垂体や視床下部での発現が高かった。このことは、グレリンがイヌでGH放出を促進する(Ohno et al., 2006)、または摂餌量を増加させる(Yokoyama et al., 2005b, Kudoh et al., 2009)という生理作用を支持する結果であった。ヒト、ラットおよびモルモットにおける検討では、嗅球、小脳でのGHS-R1a mRNAの発現は低値であったが、イヌではこの部位での発現が比較的高かった。イヌにおいては、運動や嗅覚などにグレリンが関与している可能性が示唆される。末梢組織での発現は中枢神経系でのGHS-R1a mRNAの分布に比べて極めて低く、PCRでバンドとして確認できても定量的PCRでは数値化できなかった。グレリンはラットにおいて消化管の運動を亢進するが(Fujino et al., 2003; Edholm et al., 2004; Depoortere et al., 2005)、イヌではその作用は見られない(Ohno et al., 2006)。このような背景の上で消化管におけるGHS-R1aの発現に注目したが、イヌの消化管にはGHS-R1a mRNAがほとんど発現していなかったことは、*in vivo*の成績を支持するものである。消化管におけるGHS-R1aの発現についてはこれまで、ヒト

(Takeshita et al., 2006)、モルモット、ラット(Kitazawa et al., 2011)および鳥類(ニワトリ、ウズラ)(Kitazawa et al., 2009)で検討されており、モルモット以外ではGHS-R1aの明らかな発現が確認され、特に鳥類では消化管部位に依存して発現量が変ることが知られている(そ嚢、腺胃、結腸で高発現)。一方、モルモットでは、イヌの場合と類似し消化管各部位でのGHS-R1a mRNAの発現は極めて低かった(Kitazawa et al., 2011)。ラットやニワトリでは、消化管にGHS-R1aの発現が認められることと一致して、グレリンが摘出消化管においても収縮反応を誘起するが(Edholm et al., 2004; Depoortere et al., 2005; Kitazawa et al., 2009)、モルモットの摘出消化管はグレリンに反応を示さない(Nakamura et al., 2010; Kitazawa et al., 2011)。これらのことから、イヌ摘出消化管標本でもグレリンに対する収縮反応は認められないことが推察される。

今回、グレリンと摂餌との関係を明らかにするためにグレリン濃度に与える摂餌の影響を検討した。これまでイヌ血漿中のグレリン濃度に関しては、10.3 fmol/ml(Yilmaz et al., 2007)、10~40 fmol/ml(Zietlow et al., 2010)、45 fmol/ml(Bhatti et al., 2006)、60 fmol/ml(Yokoyama et al., 2005a)、260 fmol/ml(Yilmaz et al., 2008)など様々な報告があり、今回の測定値もこれまでの報告の範囲内であった。本研究においてイヌ血漿中のグレリンとデスアシルグレリンの存在比は1:5.9と推定され、この値はYokoyamaら(2005a)の報告(1:4)にほぼ一致していた。グレリンとデスアシルグレリンの存在比は、ラットやマウスでは1:10(Hosoda et al., 2000b; Janssen et al., 2011)、ヒトでは1:6(Goodyear et al., 2010; Shiiya et al., 2011)と報告されており、イヌにおける両者の比率はヒトに近いことがわかる。このようにグレリンとデスアシルグレリンの存在比に差が出る原因として、デスアシルグレリンに脂肪酸を付加する酵素(GOAT)の活性が動物により異なっている可能性が挙げられる。また、食餌中のオクタン酸の量が増えるとグレリン濃度が上昇することが知られており(Yamato et al., 2005)、摂取する食餌の脂肪酸量とその種類によりグレリン/デスアシルグレリンの比率が変わってくる可能性もある。本研究において、1日1回または2回の摂餌条件でグレリンの日内変動を検討したが、いずれの場合にもグレリン濃度は摂餌後に有意ではないが低下する傾向にあった。グレリン濃度の減少は1日1回の摂餌の方で著明だったので、空腹

期の長さやグレリン濃度低下との間に関係があると考へ48時間の絶食後に摂餌の影響を観察したところ、有意なグレリン濃度の低下が確認できた。これらの成績は、これまでイヌで行われた同様な実験の結果 (Yokoyama et al., 2005b; Bhatti et al., 2006) や他の動物種での結果 (Cummings et al., 2001; Tschöp et al., 2001) と一致していた。イヌにおいてグレリンにより摂餌量が増加するという報告 (Yokoyama et al., 2005b; Kudoh et al., 2009) と考へ合わせると、ヒトやラットと同様にイヌにおいてもグレリンは摂餌を誘起するホルモンとして空腹期に増加、また摂餌により低下して摂餌量を調節し、エネルギーバランスの恒常性に寄与すると考へられる。今回、48時間以上絶食したイヌ (空腹期) でグレリン濃度を20分間隔で測定したところ、血中グレリン濃度が周期的に変動する可能性が示された。Zietlowら (2010) は、意識下イヌで消化管運動を測定しながら採血、ホルモン測定を行い、グレリンとモチリンいずれもが周期的に変動することを報告している。それによると、空腹期ではモチリン濃度のピークに一致して胃に伝播性収縮のPhase 3が出現するが、モチリン濃度が低下した後70%近い確率でグレリンのピークが観察され胃運動はPhase 1に移行するという。すなわち、空腹期のイヌにおいてモチリンとグレリンはいずれも周期的に変化し、前者はPhase 3 (伝播性強収縮)、後者はPhase 1 (収縮の静止期) の構築に関与していると考えられる。前述したように、これまでの報告および本研究でもイヌ血中グレリン濃度の測定値には大きなばらつきが認められたが、その原因のひとつとしてグレリン濃度が周期的に変動していることが関係しているのかもしれない。Zietlowら (2010) によれば、空腹期の周期的なモチリン、グレリン濃度の変化は、摂餌により消失し、食後期は両ホルモンともに低いレベルに維持されているという。

本実験においては、摂餌時にインスリンとグルコースの経時変化も解析した。摂餌によってグレリンは低下する傾向にあったが、逆にインスリン濃度はゆっくりと上昇し、グルコース濃度はほとんど変化しなかった。これらの結果は、Bhattiら (2006) のイヌを用いた実験の成績とよく一致していた。今回測定した3つの物質の関係については、①グルコースの経口、血中投与によりグレリンの血中濃度が低下すること (McCowen et al., 2002; Shiya et al., 2002)、②グレリンがインスリン分泌を抑制し、グルカゴン分泌を促進すること (Dezaki et al., 2004; Chuang et al., 2011)、③インスリンがグレリ

ン分泌を抑制すること (Kamegai et al., 2004)、④グルコースの上昇によりインスリンの分泌が上昇すること、が知られている。これらの関係を体系的に考へ併せると、摂餌により栄養素が吸収されグルコースが上昇し始めると、上昇によりグレリンの分泌が抑制され、インスリン分泌に対する抑制が解除される。また、グルコースは直接インスリン分泌も刺激するのでインスリンが徐々に上昇し、このインスリンの上昇はグレリン分泌をさらに抑制するとともにグルコースの上昇を抑制し、血中グルコースレベルをほぼ一定に維持していると推察できる。すなわち、イヌにおいてもグレリンは血中グルコース濃度のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでのヒトを含めた研究から、グレリンが神経性食欲不振症 (Ariyasu et al., 2001)、肥満、糖尿病 (Pusztai et al., 2008)、消化管運動不全、過敏性腸症候群や消化器系の癌と関連することが明らかになっている (Sjolund et al., 2010; Jeffery et al., 2011)。一方、イヌにおいては、肥満イヌで血中グレリン濃度が上昇する (Yokoyama et al., 2005b)、起炎刺激によりグレリン濃度が増加する (Yilmaz et al., 2008) という報告があるにすぎない。本研究は、附属動物病院に来院した疾患イヌの血中グレリン、デスアシルグレリン濃度を網羅的に測定し、疾患によりグレリン濃度が増加するかどうかを検討した。その結果、検討した疾患 (多中心型リンパ腫、消化器型リンパ腫、炎症性腸疾患、リンパ管拡張症、甲状腺機能低下症、クッシング病、アジソン病) のうち、消化器型リンパ腫、クッシング病でグレリン濃度が減少する傾向が見られた。また、興味深いことに、疾患イヌにおいて、ほとんどのケースでデスアシルグレリンとアシルグレリンの比率 (正常では5-6) が上昇し、8-12になっていた。比率が上昇する原因としては、グレリン濃度の低下またはデスアシルグレリン濃度の上昇が考へられる。グレリンの合成に必要なオクタン酸の多くは食餌から供給される (Yamato et al., 2005)。従って、病気により食欲が低下して長期間低栄養状態になるとデスアシルグレリンからグレリンへの合成が抑制され、今回のような比率の変化が起きる可能性がある。この場合、グレリン濃度の変化は疾患により引き起こされた二次的な変化となる。今回の解析では、イヌにおいてもある種の疾患で血中のグレリン濃度が増加する可能性が示唆された。しかしながら、この変化が病気に直接起因する変化なのか、間接的な変化なのかも含め、イヌの病態とグレリンとの関係を明らかにする

ためには、更に症例数を増やし調べることや、特定の疾患に標的を絞った解析が必要と考えられる。

### 5. ま と め

本研究は、獣医臨床上、重要な動物であり、グレリンの消化管運動におよぼす影響が他の哺乳類とは異なっているイヌに注目しグレリン関連の基礎的知見を集めることを目的とした。検討した点は、①GHS-R1aの構造と他動物種との比較、②GHS-R1aの組織分布、③摂餌および絶食が血中グレリン濃度に与える影響、④イヌの各種疾患におけるグレリン濃度の変化、の4点である。得られた結果を以下にまとめる。

- 1) イヌのGHS-R1aは349個のアミノ酸から構成され、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ヒトなどの哺乳動物とは85～87%程度の相同性を示した。
- 2) イヌGHS-R1a mRNAの発現は下垂体で最も高く、次いで嗅球、小脳、視床下部が高かった。大脳皮質、海馬、視床、中脳、橋および延髄でも発現が認められた。一方、末梢組織（食道、胃食道部、胃幽門部、十二指腸、空腸、回腸、結腸、心房、心室、腎臓、副腎、膵臓）での発現は無視できるレベルであり、唯一肝臓のみで発現が検出された。
- 3) イヌ血漿中のグレリン濃度は $37.2 \pm 2.9$  fmol/ml(最高値は62.7 fmol/ml, 最小値は13.1 fmol/ml)、デスアシルグレリン濃度は $198.0 \pm 20.1$  fmol/ml(最高値は464.4 fmol/ml, 最小値は49.4 fmol/ml)であった。これらの値からグレリンとデスアシルグレリンの存在比は1:5.9と推察された。
- 4) 血漿グレリン濃度は摂餌により低下する傾向があった。この減少は48時間の絶食後の摂餌時に著明であった。摂餌によっても血中グルコースには顕著な変化は認められなかったが、インスリンはゆっくりと増加した。48時間絶食させ摂餌を行わないイヌにおいて血中グレリン濃度はサージ様に上昇し一部のイヌでは周期性も認められた。
- 5) 血漿グレリン濃度を検討したイヌの疾患（多中心型リンパ腫、消化器型リンパ腫、炎症性腸疾患、リンパ管拡張症、甲状腺機能低下症、クッシング病、アジソン病）の内、消化器型リンパ腫、クッシング病において、血漿グレリン濃度が減少した。また、疾患イヌにおいて、ほとんどのケースで、デスアシルグレリンとグレリンの比率が正常イヌ

に比べて上昇していた。

系統樹解析の結果から、イヌのGHS-R1aは他の哺乳動物のそれとは異った遺伝子進化を経てきた可能性が示唆された。中枢神経系における分布は他の哺乳類とほぼ一致していたが、末梢組織での分布は肝臓以外では極めて微量であった。イヌにおいても血中グレリン濃度は摂餌により低下する傾向があり、グルコース濃度やインスリン濃度に影響を与え、エネルギーバランスの恒常性に寄与していると考えられた。本研究ではいくつかの疾患で血中グレリン濃度の変動を認めたが、変動するメカニズムを含め、イヌの病態とグレリンの関連性を体系づけるには更に多くの検討が必要と思われる。

### 謝 辞

本研究の一部は、2010年度酪農学園大学共同研究(2010-3, 代表者:北澤多喜雄)および平成23年度科学研究費助成金(23570081, 代表者:北澤多喜雄)の助成を受け行われたものである。

### 引用文献

1. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 4753-4758.
2. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology.* 2001; 120: 337-345.
3. Bhatti SF, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Van Ham LM, Duchateau L, Mol JA, van der Lely AJ, Kooistra HS. Effects of food intake and food withholding on plasma ghrelin concentrations in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2006; 67: 1557-1563.
4. Blake AD, Smith RG. Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> stimulate

- growth hormone release through distinct receptor sites. *J Endocrinol.* 1991; 129: 11-19.
5. Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology.* 1980; 106: 663-667.
  6. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology.* 1984; 114: 1537-1545.
  7. Chuang JC, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, Zigman JM. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol.* 2011; 25: 1600-1611.
  8. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 2001; 50: 1714-1719.
  9. Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience.* 2003; 120: 443-453.
  10. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 541-546.
  11. Depoortere I, De Winter B, Thijs T, De Man J, Pelckmans P, Peeters T. Comparison of the gastroprokinetic effects of ghrelin, GHRP-6 and motilin in rats in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 2005; 515: 160-168.
  12. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating  $Ca^{2+}$  signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes.* 2004; 53: 3142-3151.
  13. Edholm T, Levin F, Hellström PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept.* 2004; 121: 25-30.
  14. Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 2003; 550: 227-240.
  15. Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Ohnita K, Ohba K, Omagari K, Taniyama K, Kohno S. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004; 39: 1209-1214.
  16. Goodyear S, Arasaradnam RP, Quraishi N, Mottershead M, Nwokolo CU. Acylated and des acyl ghrelin in human portal and systemic circulations. *Mol Biol Rep.* 2010; 37: 3697-3701.
  17. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 2988-2991.
  18. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48: 23-29.
  19. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J. Biol. Chem.* 2000a; 275: 21995-22000.
  20. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000b; 279: 909-913.
  21. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ,

- Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273: 974-977.
22. Itoh Z. Motilin and clinical application. *Peptides*. 1997; 18: 593-608.
23. Janssen S, Laermans J, Verhulst PJ, Thijs T, Tack J, Depoortere I. Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 2094-2099.
24. Jeffery P, McDonald V, Tippett E, McGuckin M. Ghrelin in gastrointestinal disease. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2011; 340: 35-43.
25. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept*. 2004; 119: 77-81.
26. Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice in vivo and in vitro. *Gut*. 2005; 54: 1078-1084.
27. Kitazawa T, Maeda Y, Kaiya H. Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. *Regul Pept*. 2009; 158: 132-142.
28. Kitazawa T, Nakamura T, Saeki A, Teraoka H, Hiraga T, Kaiya K. Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides*. 2011; 32: 1876-1886.
29. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402: 656-660.
30. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol Rev*. 2005; 85: 495-522.
31. Kudoh K, Shibata C, Funayama Y, Fukushima K, Ueno T, Hayashi K, Inui A, Bowers CY, Sasaki I. The effect of growth hormone releasing peptide-2 on upper gastrointestinal contractile activity and food intake in conscious dogs. *J Gastroenterol*. 2009; 44: 297-304.
32. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276: 905-908.
33. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J. Endocrinol*. 2002; 175: R7-11.
34. Nakamura T, Onaga T, Kitazawa T. Ghrelin stimulates gastric motility of the guinea-pig through activation of a capsaicin-sensitive neural pathway: in vivo and in vitro functional studies. *Neurogastroenterol Motil*. 2010; 22: 446-452.
35. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001; 409: 194-8.
36. Ohno T, Kamiyama Y, Aihara R, Nakabayashi T, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Ghrelin does not stimulate gastrointestinal motility and gastric emptying: an experimental study of conscious dogs. *Neurogastroenterology and Motil* 2006; 18: 129-135.
37. Peeters TL. Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 2005; 54: 1638-1649.
38. Puzstai P, Sarman B, Ruzicska E, Toke J, Racz K, Somogyi A, Tulassay Z. Ghrelin: a new peptide regulating the neurohormonal system, energy homeostasis and glucose metabolism. *Diabetes Metab Res Rev.*, 2008; 24: 343-352.
39. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 240-244.
40. Shiiya T, Ueno H, Toshinai K, Kawagoe T, Naito S, Tobina T, Nishida Y, Shindo M, Kangawa K, Tanaka H, Nakazato M. Significant lowering of plasma ghrelin but not des-

- acyl ghrelin in response to acute exercise in men. *Endocr J.* 2011; 58: 335-342.
41. Sjolund K, Ekman R, Wierup N. Covariation of plasma ghrelin and motilin in irritable bowel syndrome. *Peptides.* 2010; 31: 1109-1112.
  42. Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut.* 2006; 55: 327-333.
  43. Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 22: 847-853.
  44. Takeshita E, Matsuura B, Dong M, Miller LJ, Matsui H, Onji M. Molecular characterization and distribution of motilin family receptors in the human gastrointestinal tract. *J Gastroenterol.* 2006; 41: 223-230.
  45. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001; 24: RC19-21.
  46. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res.* 2009; 41: 814-821.
  47. Yamato M, Sakata I, Wada R, Kaiya H, Sakai T. Exogenous administration of octanoic acid accelerates octanoylated ghrelin production in the proventriculus of neonatal chicks. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333: 583-589.
  48. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 2008; 132: 387-396.
  49. Yilmaz Z, Ilcol YO, Golcu E. Serum leptin and ghrelin levels in response to methylprednisolone injection in healthy dogs. *Res Vet Sci.* 2007; 82: 187-194.
  50. Yilmaz Z, Ilcol YO, Ulus IH. Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med.* 2008; 36: 828-833.
  51. Yokoyama M, Murakami N, Naganobu K, Hosoda H, Kangawa K, Nakahara K. Relationships between growth and plasma concentrations of ghrelin and growth hormone in juvenile beagle dogs. *J Vet Med Sci.* 2005a; 67: 1189-1192.
  52. Yokoyama M, Nakahara K, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin in healthy dogs. *Eur J Endocrinol.* 2005b; 152: 155-160.
  53. Zietlow A, Nakajima H, Taniguchi H, Ludwig K, Takahashi T. Association between plasma ghrelin and motilin levels during MMC cycle in conscious dogs. *Regul Pept.* 2010; 164: 78-82.

### Summary

Ghrelin is an endogenous ligand for growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) 1a and mediates various physiological responses, including growth hormone release, appetite control and gastrointestinal function. The dog is a unique animal species in that gastrointestinal motility is not stimulated by ghrelin. In this study, we identified GHS-R1a in the dog and examined its tissue distribution. In addition, changes in plasma ghrelin concentration caused by food intake or diseases were characterized using Beagle dogs and dogs that were brought to the animal hospital of Rakuno Gakuen University. Canine GHS-R1a was identified in pituitary cDNA, and consisted of 349 amino acids. The identity of the canine receptor was 85% to other mammalian GHS-R1a. Expression levels of GHS-R1a mRNA were high in the pituitary, olfactory bulb and cerebellum, moderate in the hypothalamus, pons, midbrain and medulla oblongata, and low in the cerebral cortex, thalamus and hippocampus. On the other hand, expression levels in peripheral tissues including the gastrointestinal tract were extremely low. In Beagle dogs, ratio of plasma ghrelin and des-acyl ghrelin was 1:5.9. After feeding, plasma ghrelin level decreased, but insulin level increased, resulting in maintenance of glucose level despite feeding. In the fasting period, plasma ghrelin changed periodically. Comprehensive measurements in plasma from diseased dogs showed the marked changes in

plasma ghrelin levels and in des-acyl ghrelin/ghrelin ratio in some of the dogs. In summary, canine GHS-R1a was identified, and its distribution was characterized. In dogs, it was suggested that ghrelin participates in the regulation of feeding behaviors and plasma glucose homeostasis as in other mammals. Ghrelin might be involved in the development of some diseases in dogs. Therefore, further studies are necessary to clarify the relationship between ghrelin level and canine diseases.